

9643 食塩感受性高血圧における内皮細胞機能の異常と細胞内pH

助成研究者：藤田 敏郎(東京大学 医学部)

共同研究者：安東 克之(東京大学 保健センター)

われわれは細胞内アルカリ化が内皮依存性弛緩反応を減弱させることを報告してきた。ここで、食塩感受性高血圧では内皮依存性弛緩が減弱しており、高血圧モデル動物やヒトの本態性高血圧症において細胞内pHが上昇している可能性が指摘されている。そこで、本研究では食塩感受性高血圧における内皮依存性弛緩減弱と内皮細胞内アルカリ化との関連を検討した。6週齢の幼若高血圧自然発症ラット(SHR)と同週齢のWistar-Kyotoラット(WKY)ならびに4週齢のDahlの食塩感受性(S)および食塩抵抗性(R)ラットに正常(0.66%)及び高(8%)食塩食を4週間投与し、大動脈リング標本を作製した。実験は37°Cに温め95% O₂/5% CO₂を流したKrebs-bicarbonateバッファーを用いて行なった。3×10⁻⁷ Mのノルエピネフリンで前収縮後にアセチルコリン(ACh:10⁻⁹~10⁻⁴ M)で内皮依存性弛緩を、ニトログリセリン(NTG:10⁻⁹~10⁻⁶ M)で内皮非依存性弛緩を検討した。3 mMのNH₄Clで細胞内をアルカリ化し、さらにNH₄Clを一旦添加したのち除去することによって酸性化して、その影響を見た。また、血管収縮性プロスタグランジン(PG)ならびにスーパーオキシドの関与を調べる目的でシクロオキシゲナーゼ阻害薬インドメサシン(Indo: 10⁻⁵ M)ならびにスーパーオキシドデスマターゼ(SOD: 100 u/ml)の影響も調べた。その結果、食塩負荷はWKYおよびDahl Rラットの血圧には影響しなかったが、SHRならびにDahl Sラットで血圧上昇を生じた。ACh弛緩・NTG弛緩ともに正常食塩食ではいずれの群も差はなかった。ACh弛緩は食塩負荷によりSHRもWKYも減弱したが、その程度はSHRで著明であった。また、食塩負荷によりDahl SラットのACh弛緩は減弱したが、Dahl RラットのACh弛緩は変化なかった。なお、食塩負荷によりNTG弛緩は変化なかった。細胞内アルカリ化は食塩負荷SHRならびに食塩負荷Dahl SラットのACh弛緩には影響なかったが、それ以外では正常ラットと同様に減弱した。逆に、酸性化は食塩負荷SHRならびに食塩負荷Dahl SラットのACh弛緩のみ改善した。Indoは食塩負荷SHR・食塩負荷WKY・食塩負荷Dahl SラットでACh弛緩を改善した。SODによるACh弛緩改善はIndoに比べて弱く、食塩負荷SHR・食塩負荷Dahl SラットのみACh弛緩を改善した。以上より、食塩負荷SHR・食塩負荷Dahl Sラットではすでに細胞内アルカリ化が存在しているためNH₄Cl処理の影響を受けず、酸性化により改善を認めたと考えられた。この細胞内アルカリ化が食塩高血圧における内皮依存性弛緩反応減弱に関与している可能性がある。また、SODの作用は食塩における内皮依存性弛緩反応減弱に特異的でありスーパーオキシドの関与が示唆された。

9 6 4 3 食塩感受性高血圧における内皮細胞機能の異常と細胞内pH

助成研究者：藤田 敏郎 (東京大学 医学部)

共同研究者：安東 克之 (東京大学 保健センター)

1. 研究目的

高血圧は種々の病態の集合体である。食塩負荷に対する血圧上昇反応にも個体差があり、食塩負荷で血圧が上昇しやすい食塩感受性高血圧と、血圧が上がらない食塩非感受性高血圧とがある(1)。血圧の食塩感受性亢進の病因については体液性因子・神経性因子・腎性因子などが複雑に関係し、交感神経系(1)やrenin-angiotensin系(2)の異常などが推測されているが、その病態はいまだ不明の点が多い。

最近、食塩感受性と Na^+/H^+ 交換系との関連が注目されている。たとえば、 Na^+/H^+ 交換系を過剰発現したマウスにおいては、一過性ではあるが、食塩負荷により血圧が上昇したということが報告されている(3)。また、高血圧自然発症ラット(SHR)(4)やDahlの食塩感受性(S)ラット(5)において Na^+/H^+ 交換系の亢進が指摘されている。ここで、食塩感受性高血圧モデルの一つである幼若SHRにおいては食塩負荷により血圧が上昇し、食塩感受性であることをわれわれは指摘してきたが(6)、食塩負荷幼若SHRでは大動脈の内皮依存性弛緩が減弱している(7)。このことと細胞内アルカリ化が内皮依存性弛緩を減弱するというわれわれの成績(8-10)を考え合わせると、食塩負荷幼若SHRの内皮依存性弛緩の低下に細胞内アルカリ化が関与している可能性が考えられる。そこで、食塩感受性高血圧モデルである幼若SHRとDahl Sラットを用いて、細胞内pHの内皮依存性弛緩反応に及ぼす影響を検討した。

2. 研究方法

2.1. 動物: 4週齢の雄幼若SHRと同週齢のWistar-Kyotoラット(WKY)ならびに6週齢のDahl SラットとDahl食塩抵抗性(R)ラットを用いて検討を行った。これらのラットを自由飲水自由摂食下で飼育し、正常(0.66%)食塩食あるいは高(8.0%)食塩食の負荷を4週間行った。4週間の食塩負荷後一部のラットで、ether麻醉下で頸動脈にカテーテルを挿入し、覚醒後24時間においてこれを用いて動脈圧を直接測定した。また、他のラットは胸部大動脈リング標本作製に用いた。

2.2. 胸部大動脈リング標本作製: 既報(8-10)にしたがい、ラットをetherで軽く麻醉し、胸部大動脈を取り出した。Krebs液にこれを浸し、4~5 mmのリング標本作製した。血管の内部表面を傷つけないように注意深くリング標本を扱った。なお、Krebs液の組成は NaCl 112 mM、 NaHCO_3 25.2 mM、 KCl 4.73 mM、 MgCl_2 1.19 mM、 KH_2PO_4 1.19 mM、 CaCl_2 0.9 mM、 EDTA 0.026 mMである。リング標本を95% O_2 /5% CO_2 を流しpHを7.40に保ち、温度を37°Cにした8 mlのKrebs液の入ったチャンバーに入れ、リングの下端をワイヤーで固定し、上端をトランスデューサーに連結したワイヤーで支えた。大動脈リングにresting forceとして1 gの力を加え、90分のequilibrationの時間をとった。それから、60 mMのKClでリングを収縮させ、プラトーになった時点でKrebs液で洗浄した。20分後に 3×10^{-7} Mのnorepinephrineで収縮し、 10^{-6} Mのacetylcholine (ACh)で弛緩し、内皮細胞が機能しているか否かを確認した。

Norepinephrine収縮の80%以上の弛緩を認めるものを内皮細胞が正常に機能していると考え、以下の実験に用いた。その後、Krebs液で洗浄し、20分後に 3×10^{-7} Mのnorepinephrineで前収縮し、内皮依存性弛緩を $10^{-9} \sim 10^{-4}$ MのAChで内皮非依存性弛緩を $10^{-9} \sim 10^{-5}$ Mのnitroglycerin (NTG) で検討した。

2.3.細胞内アルカリ化ならびに酸性化:これには3mMのNH₄Clを用いた(9)。Figure 1上段はNH₄Cl添加による細胞内アルカリ化の機序を、Figure 1下段はNH₄Cl添加後除去による細胞内酸性化の機序を示す。

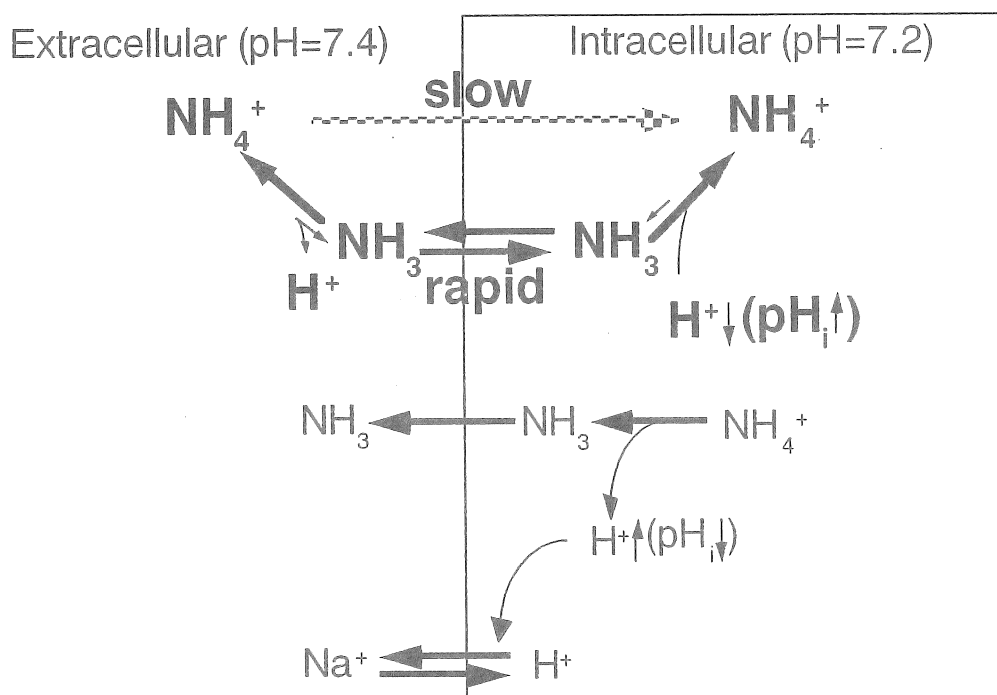


Figure 1. NH₄Clによる細胞内アルカリ化と細胞内酸性化

上段に示すように、細胞外液にNH₄Clを添加すると、これは細胞外液中ではNH₃とNH₄⁺の形に分かれて存在する。NH₄⁺はゆっくりとしか細胞内に入らないが、NH₃は急速に細胞内に入るため、細胞内ではNH₃の濃度が上昇し、NH₃+H⁺→NH₄⁺の反応が進行する。その結果、細胞内のH⁺が消費され、細胞内アルカリ化が生じる。一方、下段のようにNH₄Clを一旦添加した後除去すると細胞外にNH₃が急激に出て行くため、細胞内ではNH₄の濃度が上昇し、NH₄⁺→NH₃+H⁺の反応が進行する。すなわち、細胞内にH⁺が放出され酸性化することになる。このことを用いて3 mM NH₄Cl添加により細胞内アルカリ化を3 mM NH₄Cl添加後除去により細胞内酸性化を行った。

2.4.血管収縮性プロスタグランジンならびにスーパーオキシドの関与の検討:血管収縮性prostaglandinの関与を調べる目的で、 10^{-5} mM indomethacinの影響を、superoxideの関与を調べる目的で、100 U/mlのsuperoxide dismutase (SOD) の影響を調べた。

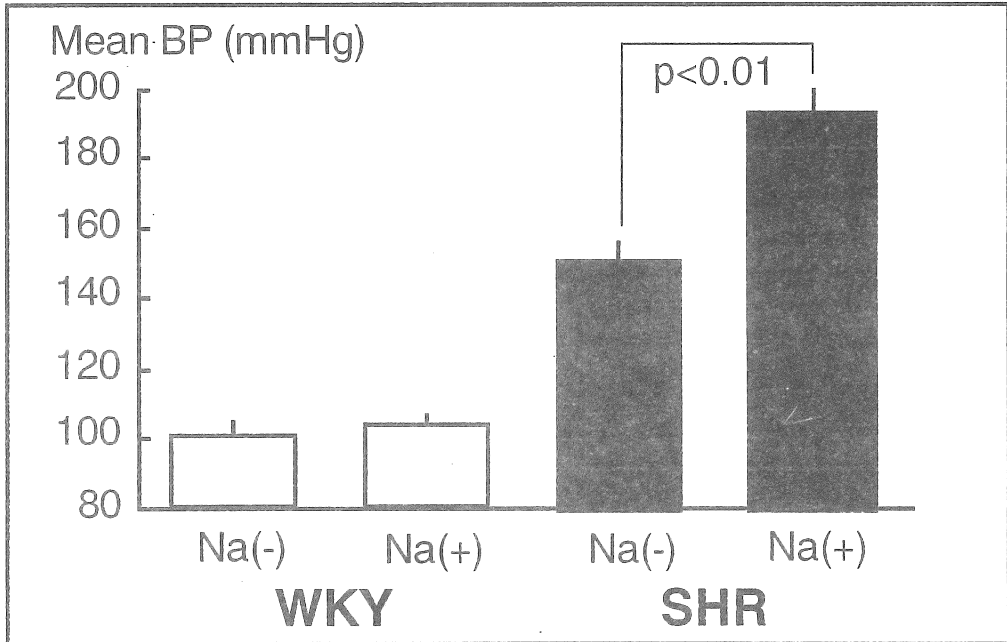
2.5.統計処理:データは平均値±標準誤差で示した。AChならびにNTGの最大弛緩

(E_{max}) と pED_{50} (50%の弛緩を生じるのに必要な濃度: 濃度[M]の負の対数で示した) を算出し、検定した。統計学的検定は二つの平均値の検定はStudentの t testで、三つ以上の平均値の検定はone-way ANOVAならびにTukeyの方法で行った。 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

3. 研究結果

3.1. 幼若SHR: WKYでは食塩負荷で平均血圧は変化しなかったが、SHRは著明な上昇を示した (Figure 2)。

Figure 2. WKYとSHRにおける食塩負荷の平均血圧への影響



これらのラットのACh弛緩ならびにNTG弛緩を検討した。Figure 3のように、SHRとWKYのACh弛緩は正常食塩食で飼育した場合には、両群で明らかな差異はなかった。食塩負荷によりSHRでもWKYでもACh弛緩は減弱した。しかし、その減弱の程度はSHRでWKYに比べて著明であった。一方、NTG弛緩はSHRとWKYで差はなく、食塩負荷の有無でも差がなかった (Figure 4)。

これらにおいて NH_4Cl による細胞内アルカリ化、 NH_4Cl 添加後除去による細胞内酸性化を行ない、ACh弛緩に対する影響を検討した。 NH_4Cl による細胞内アルカリ化により (Figure 5) (食塩負荷の有無に関わらず) WKYならびに正常食塩食のSHRは、これまでわれわれが正常ラットで報告してきたように、ACh弛緩の減弱を認めた。ところが、食塩負荷をしたSHRではACh弛緩は変化しなかった。一方、 NH_4Cl 添加後除去による細胞内酸性化は食塩負荷SHR以外の3群のACh弛緩には有意の影響はなかったが、食塩負荷SHRの減弱したACh弛緩を改善したのである

(Figure 6)。すなわち、食塩負荷SHRが他の3群と異なった反応を示した。食塩負荷SHR以外の3群はこれまでの正常ラットと同様の反応であったが、食塩負荷SHRではACh弛緩は細胞内アルカリ化は影響せず、細胞内酸性化により改善したのである (Table 1)。このことから食塩負荷SHRの内皮細胞はすでにアルカリ化しており、

これがこの高血圧モデルにおける内皮依存性弛緩の異常に関与している可能性が考えられた。

Figure 3. WKYおよびSHRのACh弛緩に対する食塩負荷の影響

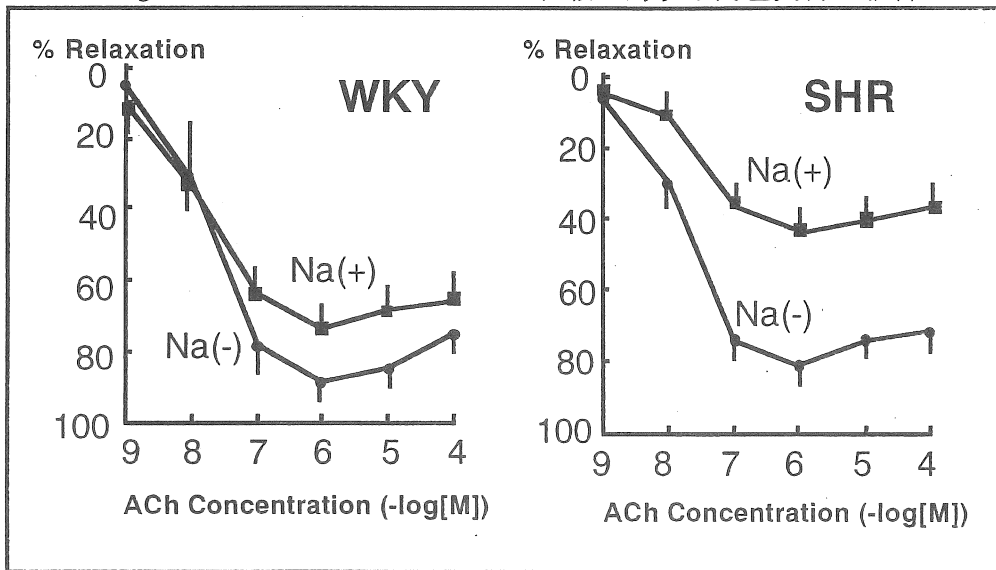


Figure 4. WKYおよびSHRのNTG弛緩に対する食塩負荷の影響

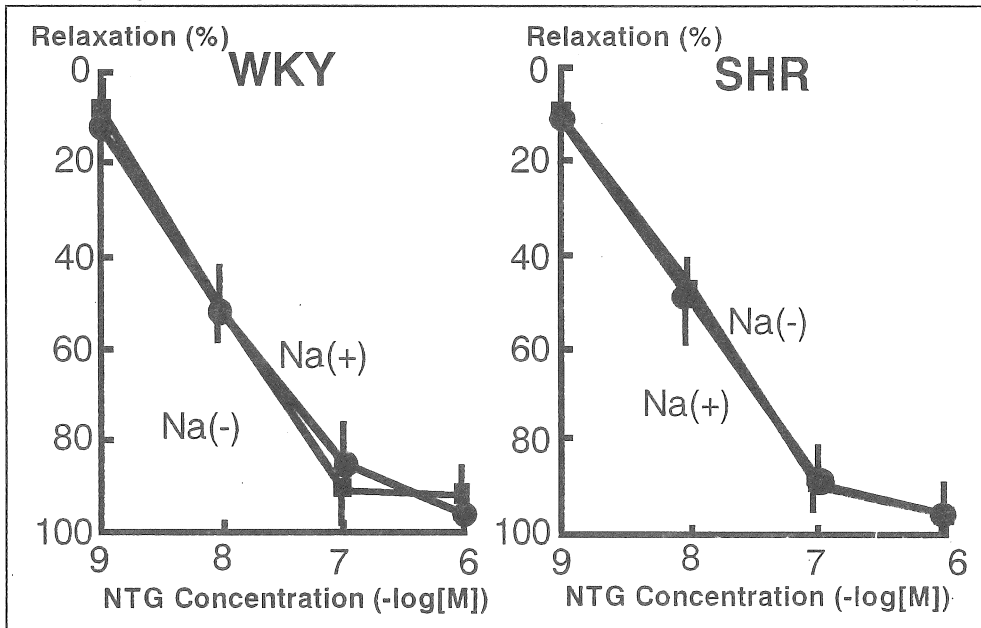


Figure 5. WKYおよびSHRのACh弛緩に対するNH₄Clの影響 (次ページ)

Figure 6. WKYおよびSHRのACh弛緩に対するNH₄Cl添加後除去の影響 (次ページ)

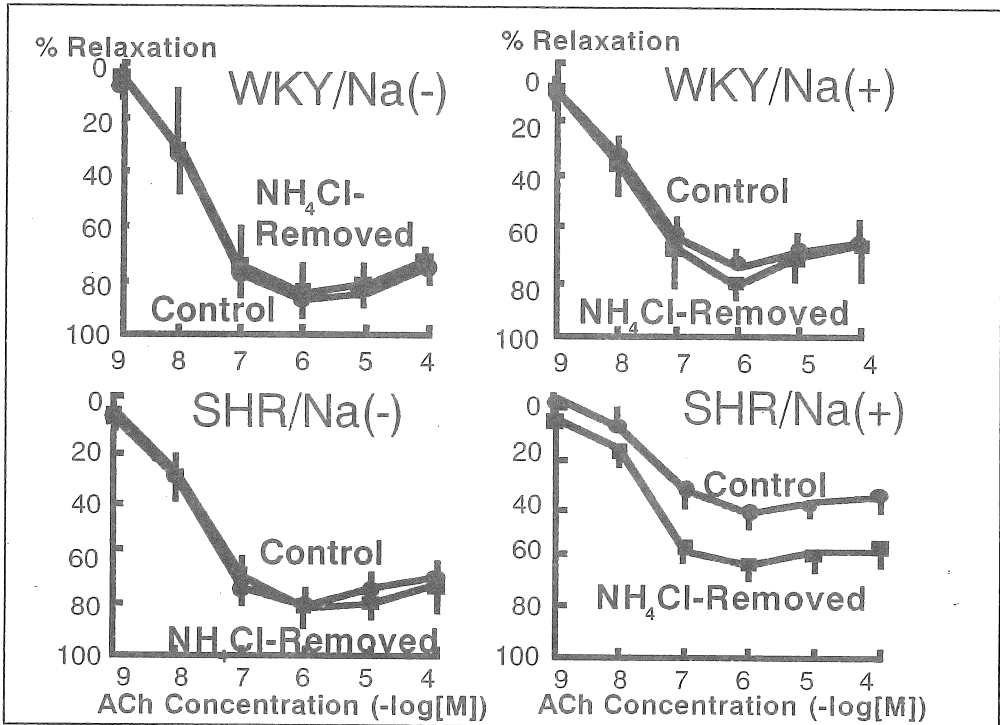
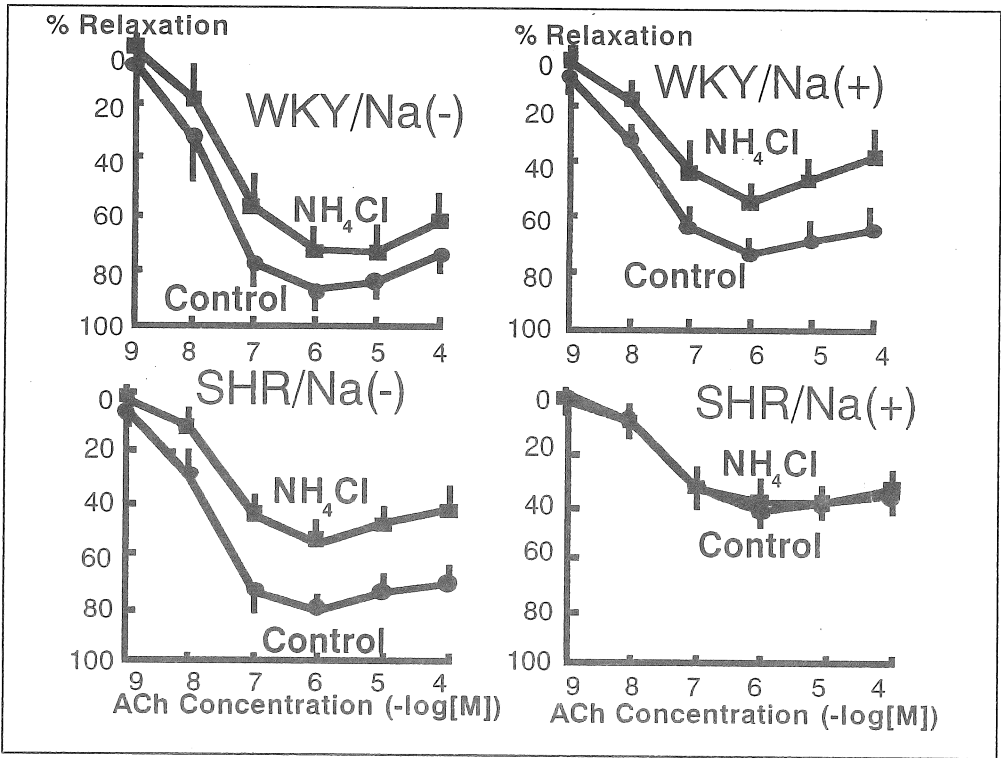
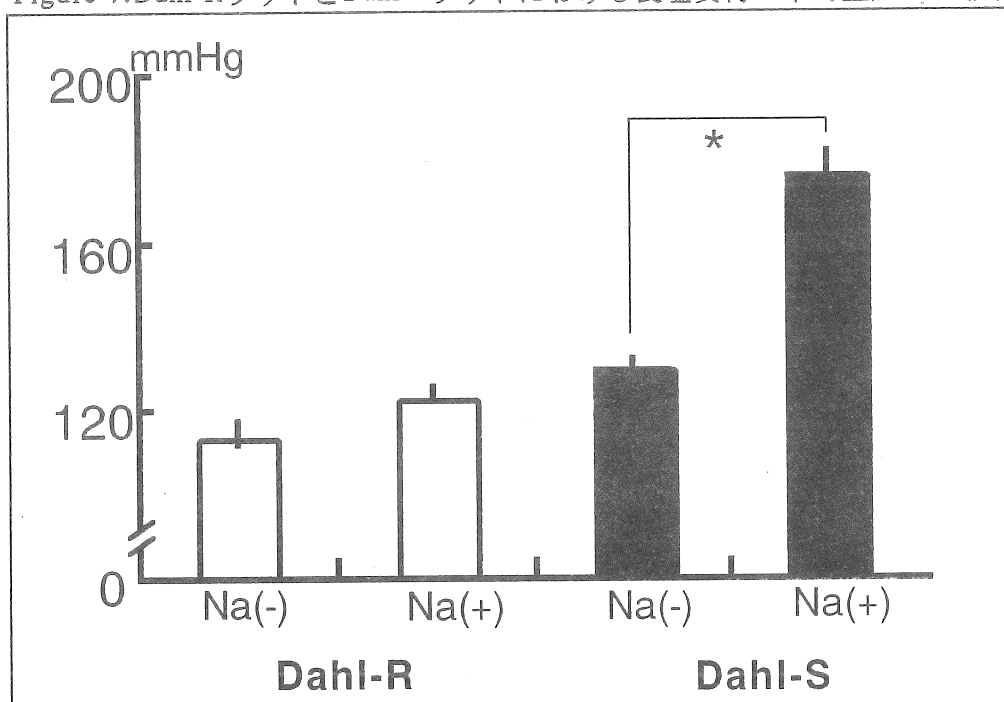


Table 1. 幼若SHRのデータのまとめ

	WKY		SHR	
	Normal	Salt	Normal	Salt
Cotrol	88±2%	76±3%*	84±3%	42±2%**
NH ₄ Cl	↓	↓	↓	~
NH ₄ Cl Removal	~	~	~	↑

さらに、indomethacinは食塩負荷WKYおよびSHRの減弱したACh弛緩をほぼ完全に回復したが、SODは食塩負荷WKYのACh弛緩には影響せず、食塩負荷SHRのACh弛緩を一部改善し、その結果、ACh弛緩は食塩負荷WKYと同程度になった。したがって、食塩負荷SHRに特異的な（細胞内pH変化の関与すると考えられる）ACh弛緩の変化にはsuperoxideが重要な役割を果たしており、血管収縮性PGはむしろより非特異的な関与をしているものと考えられた。

Figure 7. Dahl RラットとDahl Sラットにおける食塩負荷の平均血圧への影響



3.2.Dahl Sラット: Dahl Rラットでは食塩負荷で平均血圧は変化しなかったが、Dahl Sラットは著明な上昇を示した (Figure 7)。

これらのラットのACh弛緩ならびにNTG弛緩を検討した。Figure 8のように、Dahl SラットとDahl RラットのACh弛緩は正常食塩食で飼育した場合には、両群で明らかな差異はなかった。食塩負荷を行ってもDahl RラットのACh弛緩は変化しなかったが、食塩負荷によりDahl SラットのACh弛緩は減弱した。。一方、NTG弛緩はDahl SラットとDahl Rラットで差はなく、食塩負荷の有無でも差がなかった (Figure 9)。

Figure 8.Dahl RラットおよびDahl SラットのACh弛緩に対する食塩負荷の影響

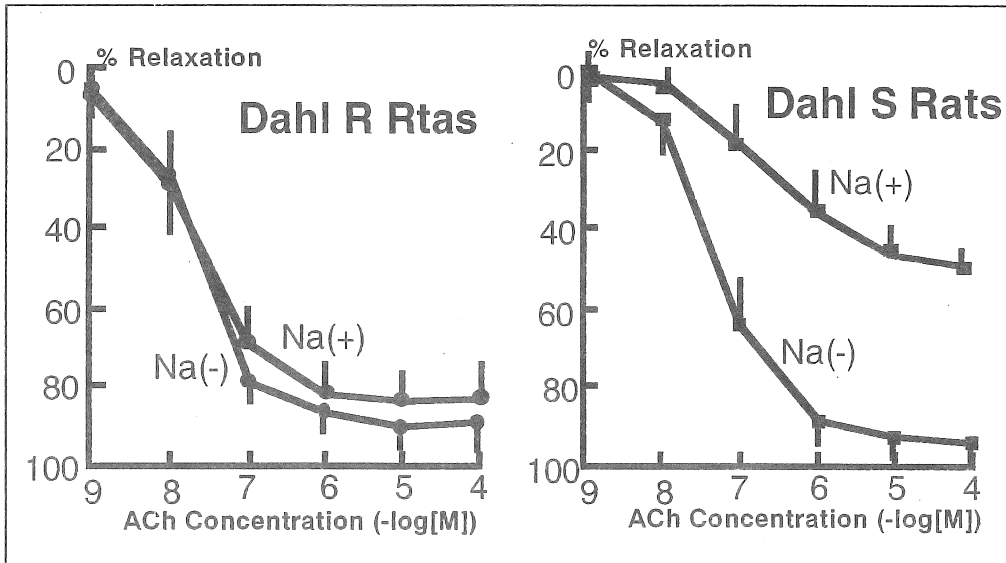


Figure 9.Dahl RラットおよびDahl SラットのNTG弛緩に対する食塩負荷の影響

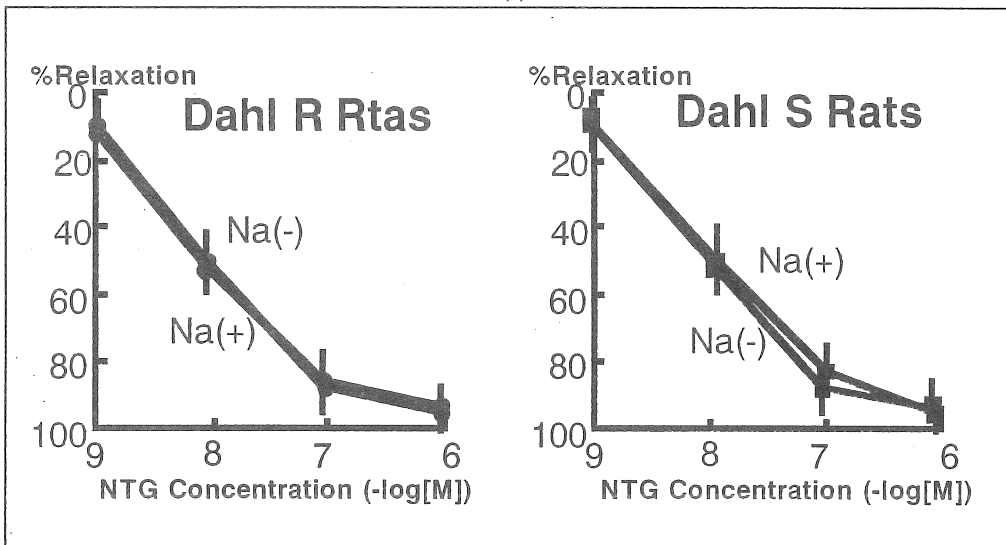


Figure 10. Dahl RラットおよびDahl SラットのACh弛緩に対するNH₄Clの影響

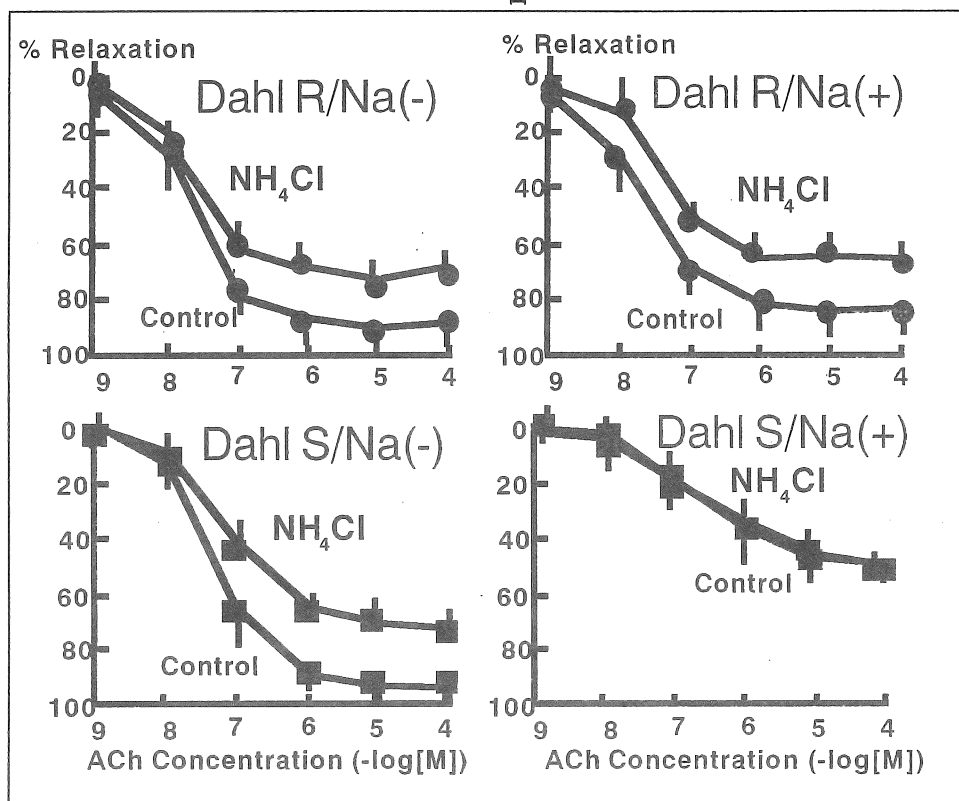


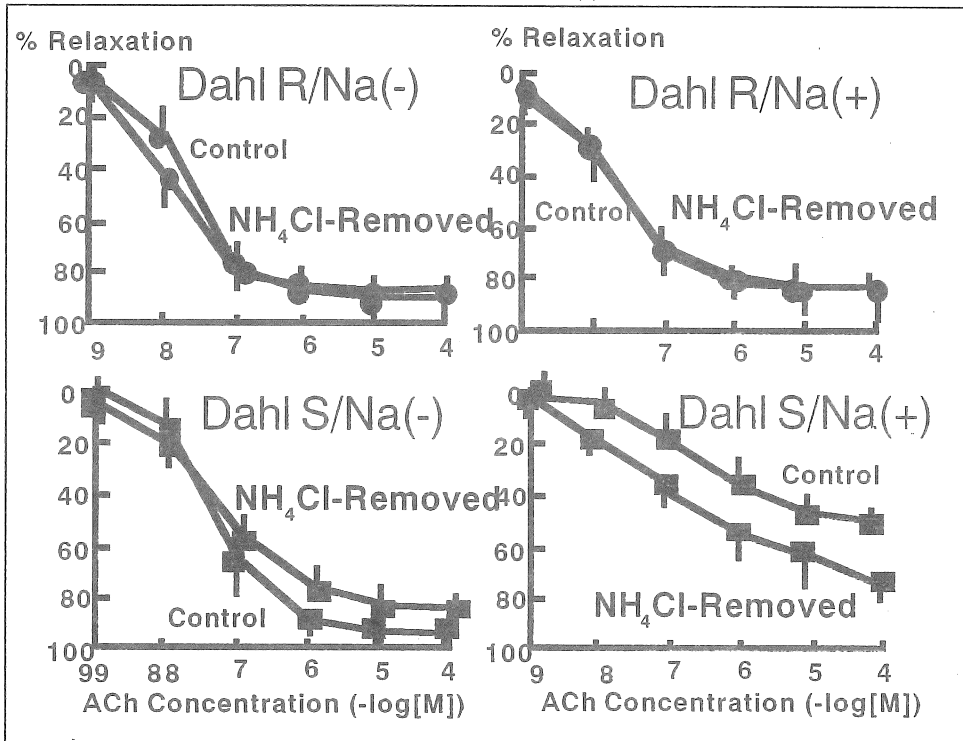
Table 2. Dahl RラットおよびDahl Sラットのデータのまとめ

	Dahl R rats		Dahl S rats	
	Normal	Salt	Normal	Salt
Control	91±4%	87±4%	93±2%	50±4%*
NH ₄ Cl	↓	↓	↓	~
NH ₄ Cl Removal	~	~	~	↑

これらにおいてNH₄Clによる細胞内アルカリ化、NH₄Cl添加後除去による細胞内酸性化を行ない、ACh弛緩に対する影響を検討した。NH₄Clによる細胞内アルカリ化により (Figure 10) (食塩負荷の有無に関わらず) Dahl Rラットならびに正常食

塩食のDahl SラットはACh弛緩の減弱を認めた。ところが、食塩負荷をしたDahl SラットではACh弛緩は変化しなかった。一方、NH₄Cl添加後除去による細胞内酸性化は食塩負荷Dahl Sラット以外の3群のACh弛緩には有意の影響はなかったが、食塩負荷Dahl Sラットの減弱したACh弛緩を改善した (Figure 11)。すなわち、SHRの場合と同様に、食塩負荷Dahl Sラットが他の3群と異なった反応を示した。食塩負荷Dahl Sラット以外の3群はこれまでの正常ラットと同様の反応であったが、食塩負荷Dahl SラットではACh弛緩は細胞内アルカリ化は影響せず、細胞内酸性化により改善した (Table 2)。このことから食塩負荷Dahl Sラットの内皮細胞はすでにアルカリ化しており、これが内皮依存性弛緩の異常に関与している可能性が考えられた。

Figure 11. Dahl RラットおよびDahl SラットのACh弛緩に対するNH₄Cl添加後除去の影響



なお、indomethacinならびにはSODはACh弛緩が変化しなかった食塩負荷Dahl Sラット以外の群では有意の影響はなかったが、食塩負荷Dahl SラットのACh弛緩を回復した。indomethacinの影響に比べてSODの影響は弱く、SODによるACh弛緩の改善の程度は細胞内酸性化によるACh弛緩改善と同程度になった。この成績は食塩負荷SHRのものと同様であった。

考察

幼若SHRやDahl Sラットといった食塩感受性高血圧において血管内皮細胞のアルカリ化が内皮依存性弛緩反応の減弱を生じている可能性が示唆された。この機序として細胞内アルカリ化によるsuperoxide産生亢進(9,10)の関与が示唆された。

文献

1. Fujita, T., Henry, W.L., Bartter, F.C., Lake, C.R., Delea, C.S.: Factors influencing blood pressure in salt-sensitive patients with hypertension. *Am. J. Med.* 69: 334-344, 1980.
2. Fujita, T., Delea, C.S., Bartter, F.C.: The role of the renin-angiotensin and prostaglandin systems in salt-sensitive and non-salt-sensitive hypertension in man. In *The Role of Salt in Cardiovascular Hypertension* (ed. by Fregly, M.J. and Kare, M.R.) Academic Press, New York, 1982: pp.207-219.
3. Kuro-o, M., Hanaoka, K., Hiroi, Y., Noguchi, T., Fujimori, Y., Takewaki, S., Hayasaka, M., Katoh, H., Miyagishi, A., Nagai, R., Yazaki, Y., Nabeshima, Y.: Salt-sensitive hypertension in transgenic mice overexpressing Na⁺-proton exchanger. *Circ. Res.* 76: 148-153, 1995.
4. LaPointe, M.S., Ye, M., Moe, O.W., Alpern, R.J., Batlle, D.C.: Na⁺/H⁺ antiporter (NHE-1 isoform) in cultured vascular smooth muscle from the spontaneously hypertensive rats. *Kid. Internat.* 47: 78-87, 1995.
5. Baba, K., : The role of renal proximal Na⁺-H⁺ exchanger in the development of hypertension in Dahl salt-sensitive rats. *Circulation* 86:I-146-, 1992.
6. Sato, Y., Ando, K., Ogata, E., Fujita, T.: High potassium diet attenuates salt-induced acceleration of hypertension in SHR. *Am J Physiol* 260: R21-R26, 1991.
7. 高橋克敏、小野歩、安東克之、下沢達雄、藤田敏郎、尾形悦郎:経口カルシウム食の降圧作用機序における内皮依存性血管反応の役割-食塩負荷自然発症高血圧ラットにおける検討. 第14回日本高血圧学会総会. P-18, 1991. (abstract)
8. Ando, K., Takahashi, K., Ono, A., Shimosawa, T., Ogata, E., Fujita, T.: Possible role of sodium-hydrogen antiport in acetylcholine-induced relaxation of rat aorta. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 177: 407-413, 1991.
9. Ando, K., Fujita, T.: Inhibitory effect of ammonium chloride on acetylcholine-induced relaxation. *Hypertension* 24: 189-194, 1994.
10. Ando, K., Fujita, T.: Role of intracellular alkalinization in inhibition of acetylcholine-induced relaxation by FMLP in rat aorta. *Am J Physiol* 271: H2405-H2410, 1996.

Attenuated Acetylcholine-Relaxation due to Intracellular Alkalinization in Salt-sensitive Hypertension.

Toshiro Fujita, Katsuyuki Ando

The 4th Department of Internal Medicine, University of Tokyo, Tokyo, Japan

Summary

The intracellular alkalinization attenuated acetylcholine (ACh) relaxation. The purpose of this study was to clarify whether the changes in intracellular pH plays a role in the attenuated ACh relaxation of salt-induced hypertension. We investigated the effect of intracellular alkalinization by 3mM NH₄Cl and acidification by removal of NH₄Cl on ACh relaxation in salt-loaded (8% salt diet, 4 weeks) and non-salt-loaded (0.66% salt diet, 4 weeks) salt-sensitive and its control rats (young [6 week-old] spontaneously hypertensive rats (SHR) and age-matched Wistar-Kyoto rats (WKY)/4 week-old Dahl salt-sensitive [S] and salt-resistant [R] rats). Salt loading increased blood pressure in young SHR but not in WKY. ACh relaxation was similar between non-salt-loaded SHR and WKY. Salt loading attenuated ACh relaxation in both SHR and WKY, which was greater in SHR. Intracellular alkalinization attenuated ACh relaxation similarly in salt-loaded and non-salt-loaded WKY. In non-salt-loaded SHR, intracellular alkalinization attenuated ACh relaxation but not in salt-loaded SHR. On the other hand, intracellular acidification did not affect ACh relaxation except for salt-loaded SHR, in which ACh relaxation was improved. Similarly, salt loading increased blood pressure in Dahl S rats but not in R rats. ACh relaxation was attenuated in salt-loaded Dahl S rats but not in other groups of Dahl rats. Intracellular alkalinization attenuated ACh relaxation in other groups than salt-loaded Dahl S rats but did not affect in salt-loaded Dahl S rats. Intracellular acidification improved ACh relaxation in salt-loaded Dahl S rats alone. Thus, we conclude that attenuation in endothelium-related relaxation of salt-loaded salt-sensitive hypertension may be due to intracellular alkalinization.